

薄 膜 电 泳

杨 畔 农

(中国科学院动物研究所)

电泳方法是对生物组成成份的分离、分析不可缺少的技术。近年来相继出现了薄膜电泳^[1]，聚丙烯酰胺凝胶电泳，等电聚焦等新的电泳技术。应用有支持物的电泳技术，不仅能鉴别和分析构成生物体的成份和生物大分子，同时对细胞的分离和纯化方面的应用也不断有发展。由于薄膜电泳所用的装置和用具可以自己制做，加上操作简便迅速，因而这样的电泳方法就成为生化研究中的常规重要技术之一。这种用支持物的电泳也叫区带电泳。薄膜电泳主要是用纤维素薄膜作为支持物，此外也有用其它薄膜作支持物的。

纤维素薄膜是把纤维素的羟基乙酰化变成二乙酸纤维素后制成的薄膜。纤维素薄膜电泳目前已广泛用于血清蛋白^[2]，脂蛋白^[3]，血红蛋白^[4]，糖蛋白^[5]，同功酶^[6]，触珠蛋白^[7]，多糖^[8]，同位素标记的材料，核酸及其衍生物^[9]，氨基酸^[10]等的分离、分析及免疫电泳^[11]等方面。

薄膜电泳的原理与纸电泳相同。

(一) 纤维素薄膜的性能

1. 纤维素薄膜吸附性很小，因而电泳后一般没有“拖尾”现象。薄膜本底无色，表现洁白，能产生清晰的分立谱带，能提高定量测定的准确性。

2. 薄膜有均匀的微孔，在化学上比较纯净的，不含半纤维素和木质素，微量重金属的含量亦极低。

3. 由白蛋白中分离 α_1 级分结果很好。

4. 分离速度快，节省时间和试验材料。在0.5—2小时内就能达到满意的分离。有时结合快速染色、脱色和干燥，在1小时内就能完成全部的电泳程序。

5. 不需要凭借复杂的技术和仪器装置，就能够成功的分离出很微量的蛋白。

6. 纤维素薄膜可以成功的用于免疫扩散技术。

7. 纤维素薄膜能很好的用于同位素标记的蛋白、核酸的研究。

8. 在分离蛋白之后，薄膜容易裁成适当小条，这对酶以及免疫的研究是有价值的。

9. 薄膜可检测少量的变性蛋白带(小的峰)，这样的少量的变性蛋白带在纸上电泳是容易丢失的。

10. 分离出的糖蛋白的染色效果好。

11. 胰岛素，溶菌酶(见图3)，组蛋白，某些动物

(如大白鼠，小白鼠)的血清等在纤维素薄膜上的分离效果很好，而在纸电泳上就不能很好分离。

(二) 试验装置和材料

1. 电泳槽：用有机玻璃制作的电泳槽容易监视样品的泳动状况和监视污染。电泳槽内的湿度对分离很有影响，所以电泳槽要密闭。作者自行设计制作的电泳槽如图1所示。另外，滤纸电泳槽稍加改装后亦可使用。

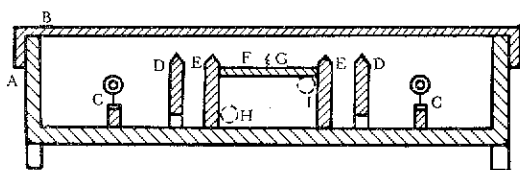


图1 电泳槽横切面示意图

A. 电泳槽； B. 盖子； C. 电极； D. 外隔板； E. 内隔板； F. 冷却槽上横板； G. 带锯齿形的中心板； H. 入水口； I. 出水口。

2. 电源：直流电源用可控硅调压，经桥式整流，阻容滤波后供直流输出。输出与市电之间有变压器隔开，故较安全。输出直流电压分0—300伏和0—600伏两档，电流分0—50毫安和0—100毫安两档，均可连续调整，满足不同场合的需要。电路中加入有反馈电路，输出电压较稳定，以电压调整均匀、平滑的比较合用。

3. 纤维素薄膜：目前国内外有各种类型的纤维素薄膜，各国也有不同的商品名称：

国内：乙酸纤维素薄膜。

英国：Calagram, Camberley, Oxoid。

德国：Sartorius Membranfilter。

意大利：Cellologel。

日本：Separax。

美国：Sepraphor, Michigen, Titan, Microzo membrane。

纤维素薄膜是表面洁白微有光泽的干燥薄膜，一般要用镊子拿取，不要用手触摸。

4. 必备的简单用具：装缓冲液、染色液，脱色液，透明液的容器(一般用有机玻璃的12×17×14厘米盒子)。竹镊子，微量点样器(0.5—2微升)，粗滤纸等。

(三) 试剂

1. 缓冲液: 一般常用 0.07 克分子浓度的巴比妥缓冲液(离子强度为 0.06, pH8.6)。为了防腐加 0.1% 浓度的叠氮化钠。

缓冲液:

巴比妥钠 12.76 克

巴比妥 1.66 克

加无离子水至 1,000 毫升

此外,凡是滤纸电泳用的缓冲液都可以使用,但在配制中除注意离子强度(0.05左右)和克分子浓度(0.1以下)外,要避免使用能溶解纤维素薄膜的有机溶剂或强酸性缓冲液。

2. 染色液: 酸性猩红 3R 以及苯胺黑等都用来染蛋白质。

(1) 酸性猩红-3R:

色素 0.8 克

三氯乙酸 3.0 克

溶于无离子水中稀释至 1,000 毫升

(2) 苯胺黑(nigrosine):

色素 0.01 克

乙酸 2.0 毫升

溶于无离子水中稀释至 1,000 毫升

苯胺黑染色极为锐敏,在薄膜上印有指纹都可以染出来。

3. 脱色液: 1—3% 的乙酸溶液。

4. 提取液: 0.01 克分子浓度氢氧化钠

5. 透明液:

冰醋酸 25 毫升 } 混合液

无水乙醇 75 毫升 }

(四) 试验操作

1. 薄膜的前处理: 根据样品数目和泳动方向、时间,把薄膜剪成适当大小的条,然后浸入到缓冲液中 5—10 分钟。取出后用粗滤纸吸去多余的缓冲液。

2. 加样: 加样的方法对分离图像很有影响的。以人血清为例,首先用微量吸管取 0.5—1.0 微升,将吸管前端垂直轻点在薄膜表面上涂成线状(每膜条宽 1 厘米加样 0.5 微升)。加样位置是由薄膜的电渗程度,缓冲液, pH 值,样品的电荷状态等所决定。

3. 通电: 膜宽 1 厘米通 0.4—0.8 毫安的定电流,通电 30—50 分钟。使用定电压电源时,为保持一定的电流要调节电压。在这样条件下向正极移动的血清蛋白和向负极移动的 γ -球蛋白之间的距离大体是 4 厘米较为合适。

4. 染色及脱色: 电泳完了后,将薄膜直接浸在染色液中数分钟,然后移到脱色液中 1—2 分钟,依次洗脱 3—4 次。如用苯胺黑染色时,要放在脱色液中 4—12 小时。脱色后,将膜上的残液用粗滤纸吸干,夹在框架上晾干。

5. 透明: 将充分晾干的纤维素薄膜浸在透明液中 1 分钟,取出贴在玻璃板上,干后即透明。

6. 定量: 透明的薄膜可直接放在光密度计上测定,或者把染色的谱带剪下用提取液提出后进行比色定量。用光密度计时在 490—540 毫米的波长下进行测定。用提取液提取时,把各染色带剪下,放在 2—3 毫升的提取液中,放置 5 分钟后用 500 毫米的波长比色测定。

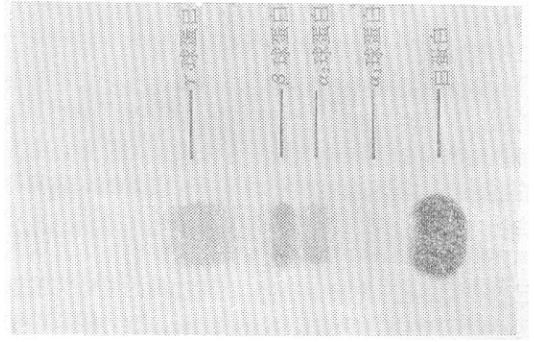


图 2 人血清电泳图像



图 3 溶菌酶的电泳图像

(五) 试验示例

1. 人血清电泳(图 2)

缓冲液: 巴比妥缓冲液, pH8.6。

电压: 100 伏, 电流: 3 毫安。

泳动时间: 1 小时。

染色液: 酸性猩红。

染色时间: 5 分钟。

由图 2 中看到,人血清蛋白分成清晰的 5 条谱带,

(下转第 30 页)

(上接第 38 页)

而且由白蛋白中分离出的 α_1 球蛋白带也是很清楚的。

2. 溶菌酶的电泳(图 3)

缓冲液: 巴比妥缓冲液, pH8.6。

电压: 100 伏, 电流: 3 毫安。

泳动时间: 1 小时。

染色液: 酸性猩红。

染色时间: 10 分钟。

由图 3 中看到, 在纸电泳上不能很好分离的溶菌酶, 用纤维素薄膜电泳能形成清晰的谱带, 而且没有“拖尾”现象。图 3 中的四个谱带都是溶菌酶在一张纤维素薄膜上的电泳图像示例。

薄膜电泳尽管分辨力比不上聚丙烯酰胺凝胶电泳, 但它具有简便、快速、分离清晰以及容易定量等优点, 因而用在测定同功酶, 多糖及核酸, 免疫电泳以及鉴别亲水性蛋白和亲两性溶剂的膜蛋白等方面, 仍不

失为试验室中有效的生化技术。

参 考 资 料

- [1] Kohn, J.: *Biochem. J.* **65**, 9, 1957.
- [2] Friedman, H. S.: *Clin. Chim. Acta* **6**, 775, 1961.
- [3] Beckering, R. E. Jr. et al.: *Am. J. Clin. Path.* **56**, 765, 1971.
- [4] Graham, J. L., and B. W. granbaum.: *Amer. J. Clin. Path.* **39**, 567, 1963.
- [5] Arai, K. et al.: *Anal. Biochem.* **31**, 71, 1969.
- [6] Barnett, Hanna: *J. Clin. Path.* **7**, 567, 1964.
- [7] Blackwell, R. Q., & C. S. Liu: *Clin. Chim. Acta* **6**, 868, 1963.
- [8] 濂野信子: 生化学实验讲座 4. 第 12 章, 362, 1976.
- [9] 竹村彰祐, 林 博司: 基础生化实验法, 5. 4. 2. 4, 288, 1976.
- [10] Scherr, G. H.: *Anal. Chem.* **34**, 777, 1962.
- [11] Schwartz, H. G.: *Am. J. Clin. Path.* **57**, 326, 1972.